

**EKSPLORASI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI SALURAN
PENCERNAAN KERANG PISAU (*Solen spp.*) YANG
BERPOTENSI SEBAGAI PROBIOTIK DI PESISIR SELATAN
KABUPATEN BANGKALAN, MADURA**

SKRIPSI

oleh
Rr. INTAN KARTIKASARI
145090101111007



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

repository.ub.ac.id

**EKSPLORASI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI SALURAN
PENCERNAAN KERANG PISAU (*Solen spp.*) YANG BERPOTENSI
SEBAGAI PROBIOTIK DI PESISIR SELATAN KABUPATEN
BANGKALAN, MADURA**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi**

oleh
Rr. INTAN KARTIKASARI
145090101111007



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

UNIVERSITAS
BRAWIJAYA

HALAMAN PENGESAHAN**EKSPLORASI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI SALURAN
PENCERNAAN KERANG PISAU (*Solen spp.*) YANG
BERPOTENSI SEBAGAI PROBIOTIK DI PESISIR SELATAN
KABUPATEN BANGKALAN, MADURA**

Rr. INTAN KARTIKASARI
145090101111007

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 19 Juli 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui
Pembimbing

Irfan Mustafa, S.Si., M.Si, Ph.D
NIP. 19781231 200801 1 021

Mengetahui
Ketua Program Studi S-1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodiyati Azrianingsih, S.Si., M.Sc., Ph.D.
NIP. 19700128 199412 2 001

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rr. Intan Kartikasari

NIM : 145090101111007

Jurusan : Biologi

Penulis Skripsi berjudul : Eksplorasi Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Kerang Pisau (*Solen* spp.) yang Berpotensi sebagai Probiotik di Pesisir Selatan Kabupaten Bangkalan, Madura.

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi.
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran

Malang, 23 Juli 2018

Yang menyatakan

Rr. Intan Kartikasari

145090101111007

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



Eksplorasi Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Kerang Pisau (*Solen spp.*) yang Berpotensi sebagai Probiotik di Pesisir Selatan Kabupaten Bangkalan, Madura

Rr. Intan Kartikasari, Irfan Mustafa

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya

2018

ABSTRAK

Kerang pisau termasuk dalam Famili Solenidae yang banyak ditemukan di pesisir pantai berlumpur. Kerang tersebut mudah terserang penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen *Vibrio harveyi*. Salah satu upaya untuk mengatasi hal tersebut dengan pemanfaatan bakteri probiotik yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Tujuan dari penelitian ini adalah mengkarakterisasi bakteri asam laktat (BAL) dari saluran pencernaan kerang pisau yang berpotensi sebagai probiotik selanjutnya dilakukan identifikasi bakteri tersebut. Isolasi BAL dilakukan menggunakan medium *De Man Rogosa Sharpe (MRS)* agar yang ditambahkan 0,004% *bromocresol purple* (BCP), 1% CaCO_3 dan 0,1% nystatin (100.000 Unit). Selanjutnya dilakukan karakterisasi meliputi pewarnaan Gram, aktivitas katalase, penghambatan terhadap *Vibrio harveyi*, toleransi terhadap asam (pH 3 & 4) dan garam empedu (0,3%, 0,5%, & 1%). Isolat terpilih diidentifikasi berdasarkan sekuen 16S rDNA. Hasil yang diperoleh terdapat 22 isolat BAL dengan karakteristik Gram positif & katalase negatif. Kedua isolat (SP5 dan SP8) mampu menghambat *Vibrio harveyi* dengan zona hambat berturut-turut sebesar $2,5 \pm 0,5$ dan $2,8 \pm 1,9$ mm. Kedua isolat tersebut memiliki *survival rate* >100% pada pH 4. Sedangkan pada pH 3 isolat SP8 yang memiliki *survival rate* tertinggi yaitu 99%. Uji toleransi terhadap garam empedu, *survival rate* tertinggi pada konsentrasi 0,3% ditunjukkan oleh isolat SP5 dan SP8 sebesar 99%, sedangkan pada konsentrasi 0,5% dan 1% ditunjukkan oleh isolat SP5. Kedua isolat tersebut memiliki similaritas 100% dengan *Lactobacillus plantarum*.

Kata kunci: BAL, garam empedu, pH, *Solen spp.*, *Vibrio harveyi*.

repository.ub.ac.id

Exploration of Probiotics Potential of Lactic Acid Bacteria from Digestive Tract of Razor Clams (*Solen spp.*) at South Coast Bangkalan, Madura

Rr. Intan Kartikasari, Irfan Mustafa

Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Brawijaya University
2018

ABSTRACT

Razor clams (*Solen spp.*) belong to Family Solenidae that are found at the muddy coast. Razor clams easily infected by pathogenic bacteria such as *Vibrio harveyi*. One effort to overcome this infection is the presence of probiotic bacteria that can inhibit the growth of the pathogenic bacteria. The objectives of this research were to characterize lactic acid bacteria (LAB) from digestive tract of razor clams that have potential as probiotics, then identification of the isolates. Lactic acid bacteria isolation was performed using De Man Rogosa Sharpe (MRS) medium with 0.004% *bromocresol purple* (BCP), 1% CaCO₃ and 0.1% nystatin (100.000 Unit). The isolate were tested the Gram staining, catalase activity, inhibition of *Vibrio harveyi*, tolerance to acids (pH 3 & 4) and bile salts (0.3%, 0.5%, & 1%). Selected LAB were identified by according to the 16S rDNA sequence. There are 22 isolates of LAB that characterized as Gram positive and catalase negative. Two isolates (SP5 and SP8) were able to inhibit *Vibro harveyi* with inhibition zone of $2,5 \pm 0,5$ and $2,8 \pm 1,9$ mm, respectively. The isolates had survival rate > 100% at pH 4 medium. While at pH 3 only isolate S8 has the highest survival rate (99%). At bile-salt tolerant test, the highest survival rate at 0.3% concentration was indicated by SP5 and SP8 isolates that were equal to 99%, while at concentrations of 0.5% and 1% were indicated by SP5 isolate. Both isolates have a similarity of 100% with *Lactobacillus plantarum*.

Keyword : Bile salt, LAB, pH, *Solen spp.*, *Vibrio harveyi*

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat, hidayah, serta inayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang merupakan syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Irfan Mustafa, S.Si M.Si, Ph.D selaku dosen yang telah mendampingi, memberikan pengarahan serta tambahan ilmu yang bermanfaat bagi penulis.
2. Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D dan Yoga Dwi Jatmiko, S.Si., M.App.Sc.Ph.D selaku dosen penguji yang telah memberikan saran yang bermanfaat untuk perbaikan penyusunan skripsi.
3. Dra. Nanik Dwi Rahayu selaku laboran laboratorium mikrobiologi fakultas matematika dan ilmu pengetahuan alam.
4. Orang tua dan keluarga yang telah memberikan bantuan serta dukungan.
5. Sahabat-sahabat terbaik dan seperjuangan: Vio, Mita, Nofa, Diah, Dean, Aldo, Vania, Arnol, Lita, Helen, Uyun, Kinanti dan rekan-rekan “AMINO” angkatan 2014 Biologi FMIPA Brawijaya yang telah memberikan semangat dan dukungan selama penelitian hingga penyusunan skripsi.

Penulisan skripsi ini merupakan upaya optimal penulis sebagai sarana terbaik dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun dari semua pihak untuk penyempurnaan yang lebih lanjut.

Malang, 23 Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK.....	v
ABSTRACT.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xiii
 BAB I PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	 4
2.1 Morfologi Kerang Pisau	4
2.2 Habitat dan Persebaran Kerang Pisau (<i>Solen spp.</i>).....	5
2.3 Penyakit pada Kerang.....	6
2.4 Bakteri Asam Laktat sebagai Probiotik.....	7
 BAB III METODE.....	 9
3.1 Waktu dan Tempat.....	9
3.2 Pengambilan Sampel dan Pengukuran Faktor Abiotik.....	9
3.3 Isolasi BAL dari Saluran Pencernaan Kerang Pisau.....	10
3.4 Pemurnian Bakteri Asam Laktat (BAL).....	10
3.5 Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL).....	11
3.5.1 Uji katalase isolat bakteri asam laktat.....	11
3.5.2 Seleksi <i>Crude Cells</i> Isolat BAL dalam menghambat bakteri patogen <i>Vibrio</i>	

<i>harveyi</i>	11
3.5.3 Uji penghambatan <i>Cell Free Supernatant</i> (CFS) BAL terhadap <i>Vibrio harveyi</i>	12
3.5.4 Uji toleransi terhadap asam.....	13
3.5.5 Uji toleransi terhadap garam empedu.....	14
3.6 Analisis Data.....	15
3.7 Identifikasi Bakteri Asam Laktat.....	15
3.7.1 Ekstraksi DNA bakteri asam laktat.....	15
3.7.2 Amplifikasi dan sekuensing 16S rDNA.....	16
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	18
4.1 Faktor Abiotik Habitat Kerang Pisau	18
4.2 Isolasi BAL dari Saluran Pencernaan Kerang Pisau.....	19
4.3 Penghambatan <i>Crude Cells</i> Isolat BAL terhadap Bakteri Patogen <i>Vibrio harveyi</i>	22
4.4 Penghambatan <i>Cell Free Supernatant</i> (CFS) isolat BAL terhadap Bakteri Patogen <i>Vibrio harveyi</i>	24
4.5 Toleransi BAL terhadap Kondisi Asam.....	25
4.6 Toleransi BAL terhadap Garam Empedu.....	28
4.7 Hasil Identifikasi Isolat Bakteri Asam Laktat.....	31
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	33
5.1 Kesimpulan.....	33
5.2 Saran.....	33
DAFTAR PUSTAKA.....	34
LAMPIRAN.....	39

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1.	Komposisi reaksi PCR.....	16
2.	Proses PCR untuk amplifikasi 16S rDNA bakteri.....	17
3.	Pengukuran faktor abiotik habitat kerang pisau.....	18
4.	Karakteristik isolat BAL yang diisolasi dari usus kerang pisau.....	20



DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1.	Morfologi kerang pisau.....	4
2.	Persebaran kerang pisau dari Famili Solenidae.....	5
3.	Penyakit pada kerang.....	6
4.	Lokasi pengambilan kerang pisau di Kabupaten Bangkalan, Madura.....	9
5.	Perubahan struktur pada <i>bromocresol purple</i> yang menyebabkan media menjadi warna kuning.....	21
6.	Penghambatan <i>crude cells</i> isolat BAL terhadap bakteri patogen <i>Vibrio harveyi</i>	23
7.	Penghambatan <i>cell free supernatant</i> isolat BAL terhadap <i>Vibrio harveyi</i>	24
8.	Toleransi bakteri asam laktat pada kondisi asam.....	26
9.	<i>Survival Rate</i> isolat bakteri asam laktat pada kondisi Asam.....	27
10.	Toleransi BAL dengan variasi konsentrasi garam empedu.....	29
11.	<i>Survival rate</i> isolat bakteri asam laktat pada kondisi media yang mengandung garam empedu.....	30
12.	Pohon filogeni isolat BAL SP5 dan SP8.....	32

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1.	Lokasi Pengambilan Sampel Kerang Pisau	39
2.	Pengukuran Faktor Abiotik Habitat Kerang Pisau.....	40
3.	Pengukuran Panjang Kerang Pisau.....	40
4.	Perhitungan <i>Total Plate Count</i> (TPC) Isolat BAL.....	41
5.	Perubahan Warna Media MRS agar yang Ditambahkan dengan <i>Bromocresol Purple</i>	42
6.	Karakterisasi Isolat Bakteri Asam Laktat.....	43
7.	Uji BAL dalam Menghambat Bakteri Patogen <i>Vibrio harveyi</i>	45
8.	Tabel Zona Hambat <i>Crude Cells</i> Isolat BAL dalam Menghambat <i>Vibrio harveyi</i>	46
9.	Tabel Zona Hambat <i>Cell Free Supernatant</i> Isolat BAL dalam Menghambat <i>Vibrio harveyi</i> ...	47
10.	Analisis Statistik Uji <i>Crude Cells</i> BAL dalam Menghambat <i>Vibrio harveyi</i>	47
11.	Analisis Statistik Uji <i>Cell Free Supernatant</i> dalam Menghambat <i>Vibrio harveyi</i>	49
12.	Uji Toleransi BAL pada Media Asam.....	50
13.	Analisis Statistik Uji Toleransi terhadap Asam...	51
14.	Hasil Uji Toleransi BAL terhadap Garam Empedu.....	53
15.	Analisis Statistik Toleransi BAL terhadap Garam Empedu.....	54
16.	Hasil Identifikasi Isolat Bakteri Asam Laktat.....	57
17.	Hasil Pewarnaan Gram dan Uji Katalase.....	58
18.	Pembuatan Medai TSA <i>Soft Agar</i>	59

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
BAL	Bakteri Asam Laktat
BCP	<i>Bromocreol Purple</i>
CaCO ₃	<i>Calcium carbonate</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
CFS	<i>Cell Free Supernatant</i>
CLEMAM	<i>Check List of European Marine Mollusca</i>
H ₂ O ₂	Hidrogen Peroksida
ITIS	<i>Integrated Taxonomic Information System</i>
MRS	<i>De Man Rogosa and Sharpe</i>
NaCl	<i>Sodium Chloride</i>
OBSIS	<i>Ocean Biogeographic Information System</i>
OD	<i>Optical Density</i>
PCR	<i>Pol ymerase Chain Reaction</i>
PPT	<i>Part Per Thousand</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
WS-RLO	<i>Syndrome Rickettsia-Like Organism</i>

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Nama unit</u>
µm	mikrometer
nm	nanometer

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Solen spp. atau kerang pisau merupakan anggota dari Famili Solenidae yang termasuk dalam kelas Bivalvia. Secara morfologi, kerang pisau memiliki cangkang memanjang dan tipis dengan permukaan halus (Wahyuni dkk., 2016). Kerang tersebut sering disebut sebagai kerang pisau karena memiliki bentuk yang menyerupai pisau lipat dan sering disebut juga sebagai kerang bambu karena memiliki cangkang berwarna hijau kecoklatan dengan garis-garis berwarna putih yang sekilas menyerupai bambu (Trisyani & Karma, 2015). Kerang pisau dapat ditemukan di pesisir pantai dengan karakter sedimen berupa pasir berlumpur (Wahyuni dkk., 2016).

Kerang pisau di Indonesia dapat ditemukan di pesisir selatan Pulau Madura dan merupakan komoditas khas dari daerah tersebut. Kelimpahan kerang pisau sebanyak 7 hingga 9 individu setiap transek 25 x 25 cm². Kerang ini sering dimanfaatkan sebagai bahan pangan di daerah tersebut karena memiliki nilai ekonomis dan bergizi tinggi (Wahyuni dkk., 2016). Kerang pisau umumnya diolah menjadi makanan camilan dalam bentuk keripik serta dijadikan oleh-oleh khas Madura. Kerang ini diketahui memiliki taurin yang berpotensi untuk menurunkan kolesterol (Nurjanah dkk., 2008; Nurjanah dkk., 2013).

Kerang pisau di Filipina diketahui dapat terserang penyakit *brown ring* yang merupakan penyakit kronis pada cangkang yang ditandai dengan adanya warna kecoklatan di tepi bagian dalam kerang. Penyakit ini disebabkan oleh *Vibrio harveyi* yang menyebabkan penurunan populasi akibat meningkatnya mortalitas (Guerra dkk., 2011; Friedman dkk., 2009). Di Indonesia masih belum ada laporan mengenai penyakit yang menyerang kerang tersebut. Namun, *Vibrio* spp. diketahui pernah menyebabkan kematian secara masal pada budidaya kerang mutiara. Bakteri patogen tersebut menyerang kerang pada saat pengangkutan dalam tangki akibat sirkulasi air dan udara yang tidak mencukupi selama perjalanan. Infeksi ini dapat juga terjadi pada saat pembenihan kerang mutiara yang masih berupa

larva (Anggorowati, 2008). Berdasarkan penjelasan mengenai patologi tersebut diketahui bahwa banyak *Bivalvia* yang juga berpotensi terserang penyakit. Oleh karena itu, diperlukan upaya pencegahan untuk menekan pertumbuhan bakteri patogen tersebut. Salah satunya adalah dengan pemberian bakteri probiotik.

Bakteri probiotik memiliki manfaat untuk menjaga keseimbangan mikroflora pada saluran pencernaan. Bakteri probiotik dapat melindungi *host* dari patogen karena dihasilkannya senyawa metabolit untuk menghambat pertumbuhan organisme lain. Contoh bakteri probiotik adalah bakteri asam laktat yang diketahui berperan dalam meningkatkan toleransi atau resistensi terhadap serangan penyakit. Bakteri asam laktat diketahui dapat menghasilkan senyawa penghambat pertumbuhan bakteri patogen penyebab penyakit pada budidaya perikanan (Zorriehzahra dkk., 2016).

Meskipun belum ada laporan mengenai penyakit pada kerang pisau di Pulau Madura, namun kerang tersebut berpeluang untuk terserang oleh *Vibrio harveyi*. Oleh karena itu, diperlukan langkah antisipatif untuk mencegah terjangkitnya penyakit pada organisme tersebut. Berdasarkan penjelasan di atas maka diperlukan adanya penelitian mengenai keberadaan bakteri asam laktat yang berperan sebagai probiotik pada saluran pencernaan kerang pisau.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana karakteristik bakteri asam laktat dari saluran pencernaan kerang pisau yang berpotensi sebagai probiotik?
2. Jenis bakteri asam laktat apa saja yang didapatkan dari saluran pencernaan kerang pisau dan berpotensi sebagai probiotik?

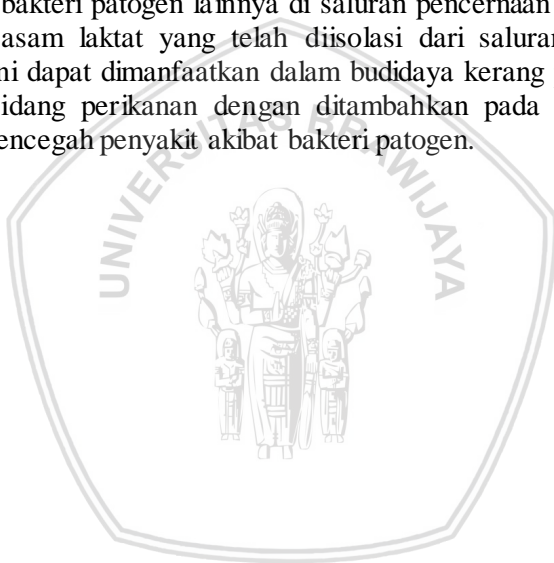
1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Karakterisasi bakteri asam laktat dari saluran pencernaan kerang pisau yang berpotensi sebagai probiotik.
2. Identifikasi bakteri asam laktat dari saluran pencernaan kerang pisau yang berpotensi sebagai probiotik.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat memperoleh jenis bakteri asam laktat yang dapat menekan pertumbuhan *Vibrio harveyi* ataupun bakteri patogen lainnya di saluran pencernaan kerang pisau. Bakteri asam laktat yang telah diisolasi dari saluran pencernaan kerang ini dapat dimanfaatkan dalam budidaya kerang pisau maupun dalam bidang perikanan dengan ditambahkan pada pakan ternak untuk mencegah penyakit akibat bakteri patogen.



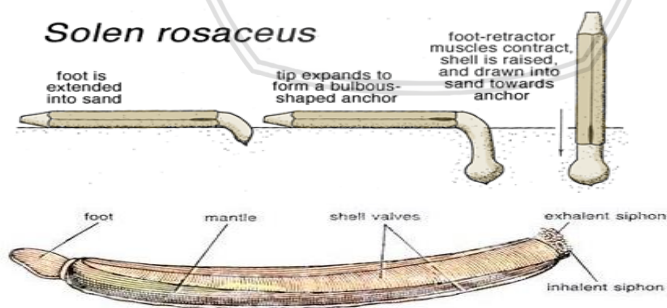
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Morfologi Kerang Pisau

Kerang pisau memiliki ukuran panjang berkisar 4 - 7,5 cm dengan bentuk menyerupai pisau lipat, berwarna cokelat dengan garis-garis cokelat yang berbuku - buku / menyerupai bambu serta memiliki cangkang simetris. Kerang pisau memiliki habitat di substrat pasir berlumpur di pesisir pantai dengan suhu berkisar antara 29 - 30°C, salinitas berkisar 31 - 32 ppt dan pH berkisar 7,9 - 8,0. Kerang pisau ini tersebar luas di Pulau Madura yang ditemukan mulai dari Bangkalan hingga Sumenep. Kerang ini sering digunakan sebagai bahan makanan oleh masyarakat sekitar. Tingginya nilai gizi pada kerang pisau menjadikan spesies ini berpotensi untuk *overfishing* (Wahyuni dkk., 2016; Nurjanah, 2013).

Kerang pisau memiliki podos (kaki) yang berfungsi untuk menggali pada sedimen sehingga kerang ini sering ditemukan di bagian dalam lumpur. Podos tersebut dapat memanjang untuk menembus bagian dalam dari sedimen dan membawa tubuhnya masuk ke dalam sedimen (Gambar 1). Kerang ini terselubungi oleh mantel yang di dalamnya terdapat *exhalent siphon* dan *inhalent siphon* yang digunakan sebagai pernapasan pada kerang tersebut (Saeedi dkk., 2013).

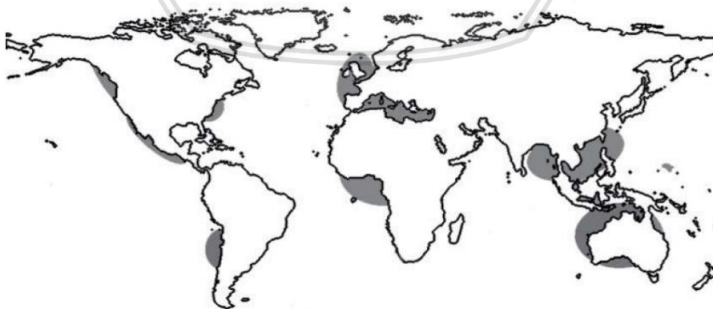


(Asnailsodysey, 2010; Shah, 2016).

Gambar 1. Morfologi kerang pisau.

2.2 Habitat dan Persebaran Kerang Pisau (*Solen* spp.)

Kerang pisau dapat ditemukan hingga kedalaman 110 cm dan distribusi dari kerang ini tersebar luas di laut tropis yang beriklim sedang. Kerang pisau termasuk dalam Famili Solenidae yang sebagian besar dapat ditemukan di wilayah Indo-pasifik. Kerang tersebut juga ditemukan di wilayah Eropa seperti Spanyol dengan jenis *Ensis arcuatus*, *Ensis siliqua* yang sering disebut kerang pisau lipat dan jenis *Solen marginatus*. Kerang tersebut ditemukan pula di pantai Atlantik Amerika Utara dan di seluruh penjuru utara Eropa. Berdasarkan data yang terdapat pada *Ocean Biogeographic Information System* (OBSIS) dan *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS) serta *Check List of European Marine Mollusca* (CLEMAM) seperti yang diilustrasikan pada Gambar 2 menunjukkan peta distribusi dari Solenidae. Pusat distribusi terletak di pantai Eropa membentang sampai ke daerah tropis Afrika Barat, pantai Amerika Utara dan Indo-pasifik. Persebaran kerang pisau tersebut menunjukkan bahwa lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhan kerang pisau berada di wilayah tropis dan subtropis (Guerra dkk., 2011). Persebaran kerang pisau di Indonesia banyak ditemukan di Pulau Jawa yaitu di sekitar pantai Kejawanan, Cirebon Jawa Barat dan juga melimpah di bagian selatan Pulau Madura. Persebaran kerang tersebut dapat ditemukan mulai dari Bangkalan, Sampang, Pamekasan hingga Sumenep di Wilayah Pulau Madura (Abida dkk., 2014; Nurjanah dkk., 2013).



(Guerra dkk., 2011)

Gambar 2. Persebaran Kerang Pisau dari Famili Solenidae.

2.3 Penyakit pada Kerang

Penyakit yang dapat menyerang kerang pisau dapat disebabkan oleh bakteri Gram negatif yang berupa *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* dan *Vibrio*. Bakteri dari genus *Vibrio* dan *Pseudomonas* sering menyerang saluran pencernaan yang dapat menyebabkan nafsu makan berkurang sehingga kerang lemah dan dapat mengalami kematian (Guerra dkk., 2011). Bakteri dari genus *Vibrio* yaitu *Vibrio harveyi* dapat menyebabkan penyakit *brown ring* (Gambar 3). Penyakit *brown ring* merupakan penyakit kronik pada cangkang yang dikarakteristikan dengan adanya warna kecokelatan di tepi bagian dalam kerang misalnya dapat ditemukan pada tiram. Penyakit lainnya yang dapat dialami tiram adalah “*Withering Syndrome of Abalone*” (Gambar 3). Penyakit ini disebabkan oleh *Candidatus Xenohalictis californiensis* yang merupakan organisme *Rickettsia-like* dan sering juga disebut sebagai *Syndrome Rickettsia-Like Organism* (WS-RLO). Penyakit ini menyebabkan populasi dari kerang menurun karena mortalitas yang tinggi. Penyakit ini menginfeksi saluran pencernaan sehingga menyebabkan penurunan nafsu makan dan kerang menjadi lemah (Guerra dkk., 2011; Friedman dkk., 2009).



(Paillard, 2017)



(Wildlife, 2016)

Gambar 3. Penyakit pada kerang: (a) *brown ring*, (b) *Withering Syndrome of Abalone*.

2.4 Bakteri Asam Laktat sebagai Probiotik

Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang memiliki karakteristik berupa Gram positif, tidak membentuk endospora, katalase negatif, tahan pada kondisi asam dan bersifat fakultatif anaerob. Sifat fakultatif anaerob adalah bakteri yang mampu hidup baik dengan oksigen ataupun tanpa adanya oksigen. Bakteri asam laktat dengan adanya oksigen akan memanfaatkan oksigen tersebut melalui oksidasi flavoprotein. Bakteri ini memiliki enzim antioksidatif yang berfungsi untuk menghilangkan adanya oksigen aktif. Hal ini menyebabkan bakteri asam laktat dapat toleran dengan adanya oksigen (Sonomoto & Atsushi, 2011). Bakteri asam laktat bersifat nonpatogen dan banyak dimanfaatkan dalam bidang industri seperti fermentasi makanan. Hal ini disebabkan karena bakteri asam laktat dapat memproduksi asam organik yaitu asam laktat yang biasanya digunakan sebagai pengawet produk pangan (Widodo dkk., 2018). Contoh bakteri asam laktat adalah *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* dan *Lactobacillus*. Bakteri tersebut dapat memetabolisme gula dan menghasilkan asam laktat. Bakteri asam laktat juga dapat ditemukan sebagai flora normal pada usus untuk merangsang sistem kekebalan pada *host*-nya (Pierre-Marie dkk., 2014; Forhad dkk., 2015).

Bakteri asam laktat yang diisolasi dari hewan akuatik dapat berperan sebagai pencegahan penyakit akibat adanya bakteri patogen. Penyakit pada ikan dapat diatasi dengan adanya bakteri asam laktat yang mampu memproduksi senyawa antibakteri. Penyakit tersebut misalnya pada ikan yang dapat disebabkan karena bakteri patogen seperti *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas caviae*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Vibrio splendidus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium tyrobutyricum* dan masih banyak lagi. Bakteri asam laktat diketahui dapat menghasilkan senyawa asam organik berupa asam laktat yang dapat membuat kondisi di sekitarnya bersifat asam dengan adanya penurunan pH. Kondisi yang asam tersebut memungkinkan bakteri lain tidak dapat tumbuh pada lingkungan tersebut (Lahtinen dkk., 2012). Bakteri asam laktat juga dapat menghasilkan suatu senyawa protein berupa bakteriosin. Bakteriosin dapat memberikan efek bakteriostatik ataupun bakteriosidal terhadap pertumbuhan mikroorganisme lainnya.

Bakteriosin dihasilkan melalui aktivitas ekstraseluler yaitu protein yang disintesis langsung di ribosom. Bakteriosin tidak membahayakan mikroflora pada usus karena dapat dicerna langsung oleh enzim-enzim (Sunaryanto & Tarwadi, 2015).

Bakteri asam laktat dapat ditemukan pada saluran pencernaan hewan maupun manusia. Bakteri yang dapat berperan sebagai probiotik yaitu bakteri yang dapat dikonsumsi baik hewan maupun manusia untuk meningkatkan kesehatan. Bakteri probiotik memiliki pengaruh menguntungkan bagi makhluk hidup lainnya karena memiliki manfaat untuk menjaga keseimbangan mikroflora intestinal. Probiotik dapat melindungi *host* dari patogen. Syarat dari bakteri probiotik yaitu (Vine dkk., 2006; Widiyaningsih, 2011):

1. Secara alami terdapat pada saluran pencernaan
2. Mampu menempel pada sel epitel usus
3. Mampu bertahan hidup pada kondisi asam (asam lambung) dan garam empedu
4. Menghasilkan senyawa antimikroba (bakteriosin)
5. Tahan terhadap antibiotik

Bakteri probiotik memiliki kemampuan untuk menguraikan rantai panjang karbohidrat, protein dan lemak sehingga dapat membantu dalam penyerapan pada sistem pencernaan. Bakteri probiotik juga mendapat keuntungan berupa energi dari penguraian senyawa kompleks tersebut. Bakteri probiotik misalnya *Lactobacillus casei* dan *Lactobacillus bulgaricus* dapat meningkatkan produksi makrofag dan mengaktifkan fagosit sehingga dapat membantu dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Bakteri patogen akan difagosit oleh sistem kekebalan tubuh *host* dengan adanya stimulus dari bakteri probiotik. Bakteri probiotik yang biasa ditemukan di intestinal pada moluska misalnya *Roseobacter sp.* dan *Lactobacillus sporogenes* (Vine dkk., 2006; Widiyaningsih, 2011).

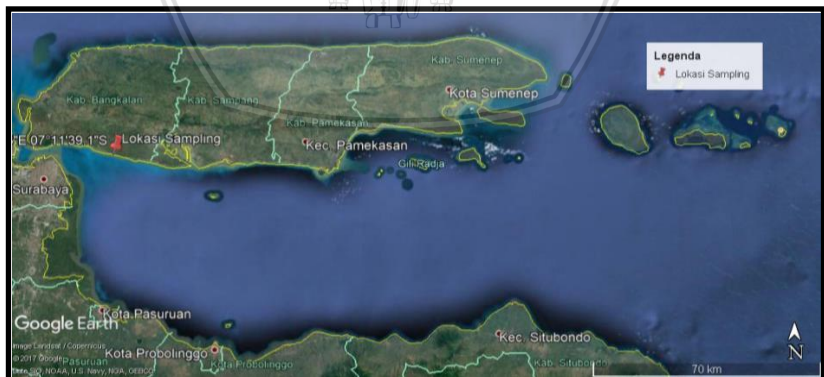
BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan mulai dari November 2017 - Juni 2018. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Pengambilan Sampel dan Pengukuran Faktor Abiotik

Pengambilan sampel kerang pisau dilakukan di pesisir pantai bagian selatan di Desa Modung, Kabupaten Bangkalan, Madura. Pengambilan sampel tersebut dilakukan pada tiga titik lokasi yang berjarak ± 40 m. Lokasi pengambilan sampel dapat dilihat pada Gambar 4. Penangkapan kerang pisau dilakukan dengan cara sedimen digali hingga terlihat bagian yang berlubang kemudian ditaburkan kapur sehingga kerang akan muncul ke permukaan dan kerang dapat diambil. Pengukuran abiotik dilakukan dengan mengukur salinitas, suhu, pH dan konduktivitas berturut - turut dengan menggunakan refraktometer, termometer digital, pH meter, dan *conductivity meter*.



Gambar 4. Lokasi pengambilan kerang pisau di Kabupaten Bangkalan, Madura.

3.3 Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Kerang Pisau (*Solen* spp.)

Isolasi bakteri asam laktat dari saluran pencernaan kerang pisau dilakukan dengan cara sebanyak sepuluh kerang dari masing - masing titik pengambilan sampel dipilih dengan ukuran yang seragam. Kerang kemudian dibedah di bagian sistem pencernaannya dan diambil bagian ususnya. Usus yang telah diambil kemudian dibilas dengan aquades steril. Tahap berikutnya, usus ditimbang terlebih dahulu. Usus yang terambil sebanyak $67,7 \pm 3,8$ mg dengan ukuran $4,58 \pm 0,3$ cm. Tahap selanjutnya usus dimasukkan ke dalam 2 mL garam fisiologis (0,85 % NaCl). Usus kemudian dihomogenasi dengan menggunakan ujung dari *blue tip* hingga hancur dan tersuspensi. Suspensi kemudian diencerkan hingga 10^{-4} yang dilakukan dengan cara diambil 0,1 mL dari suspensi usus dan diinokulasi ke dalam 0,9 mL garam fisiologis steril (0,85 % NaCl) dan divorteks. Suspensi diambil kembali sebanyak 0,1 mL dan diinokulasikan pada 0,9 mL garam fisiologis pada *microtube* yang lain, kemudian divorteks untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} . Langkah ini dilanjutkan hingga mendapatkan pengenceran 10^{-4} kemudian dari masing-masing pengenceran diambil sebanyak 0,1 mL dan diinokulasi dengan metode *spread plate* pada cawan yang berisi media MRS agar yang ditambahkan dengan *nystatin* sebanyak 0,1 % (100.000 Unit) serta 0,004 % *bromocresol purple*, dan 1 % CaCO_3 dalam 100 mL media. Sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Penambahan *bromocresol purple* bertujuan untuk indikator adanya penurunan pH (menjadi berwarna kuning) akibat aktivitas bakteri asam laktat. Rentang nilai pH pada BCP adalah 6,8 (ungu) - 5,2 (kuning).

3.4 Pemurnian Bakteri Asam Laktat (BAL)

Koloni bakteri yang menunjukkan perubahan warna media menjadi kuning setelah ditambah dengan *bromocresol purple* dan adanya zona bening maka dipilih sebagai isolat yang diuji selanjutnya. Pemurnian bakteri dilakukan dengan cara kuadran *streak* pada media MRS agar yang telah ditambah 0,004 % *bromocresol purple*. Isolat terpilih kemudian dikonfirmasi kemurniannya dengan

pewarnaan Gram. Koloni bakteri asam laktat yang murni kemudian dibuat stok dan dilakukan subkultur pada MRS agar miring. Sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Isolat BAL selanjutnya disimpan pada suhu 4°C untuk uji berikutnya.

3.5 Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL)

3.5.1 Uji katalase isolat Bakteri Asam Laktat

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri yang diuji mengandung enzim katalase. Bakteri asam laktat akan menghasilkan uji katalase negatif karena tidak memiliki enzim katalase (Hawaz, 2014; Sonomoto & Atsushi, 2011). Metode ini dilakukan dengan cara menyiapkan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% sebanyak dua tetes pada bagian tengah gelas obyek yang bersih. Satu ose biakan dipindahkan secara aseptis ke tetesan H_2O_2 3% dan dicampur. Reaksi dikatakan negatif apabila tidak terbentuk gelembung gas (seperti busa).

3.5.2 Seleksi *crude cells* isolat BAL dalam menghambat bakteri patogen *Vibrio harveyi*

Uji penghambatan isolat BAL terhadap bakteri patogen *Vibrio harveyi* dilakukan dengan menggunakan *blank paper discs*. Isolat *Vibrio harveyi* diperoleh dari Laboratorium Divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan, Universitas Brawijaya. Metode ini dilakukan dengan cara isolat BAL pada MRS agar miring diinokulasikan pada 10 mL MRS *broth* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kultur BAL yang berisi *crude cells* kemudian dilakukan pengukuran densitas selnya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. *Crude cells* BAL kemudian disamakan densitas selnya dan diinokulasikan 1 mL pada 9 mL MRS *broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur patogen diinokulasikan pada media 10 mL TSB dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C. Kultur patogen kemudian dihitung densitas selnya dengan menggunakan haemositometer hingga mencapai jumlah sel sebesar 10^6 CFU/mL. Kultur patogen tersebut selanjutnya diinokulasikan sebanyak 0,1 mL pada media 0,6% TSA (*soft agar*) dan dilakukan metode *spread plate*.

Penggunaan media *soft agar* bertujuan untuk memperlebar difusi pada pertumbuhan bakteri patogen sehingga zona hambat akan terlihat dengan jelas. Cawan petri tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama 1 jam untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen terlebih dahulu. *Crude cells* isolat BAL untuk uji antagonis ini kemudian diinokulasikan sebanyak 50 µl pada *blank paper disc*. *Blank paper disc* yang telah berisi *crude cells* BAL kemudian diinokulasikan pada media TSA kemudian diinkubasi kembali pada suhu 4°C selama 30 menit yang bertujuan untuk memaksimalkan difusi untuk pertumbuhan bakteri pada media. Tahap berikutnya sampel diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam. Kontrol negatif yang digunakan adalah media MRS *broth* tanpa kultur BAL. Zona hambat yang terbentuk diukur dengan persamaan (1)

$$\text{Zona Hambat (mm)} = \text{Zona bening} - d \dots\dots\dots(1)$$

Keterangan:

d = diameter *blank paper discs*

3.5.3 Uji penghambatan *cell free supernatant* (CFS) Bakteri Asam Laktat terhadap *Vibrio harveyi*

Uji penghambatan CFS terhadap *Vibrio harveyi* dilakukan dengan cara isolat bakteri asam laktat ditumbuhkan pada media MRS *agar slant* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Sebanyak 1 ose isolat diambil dan diinokulasikan pada 10 mL MRS *broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur BAL tersebut kemudian diukur densitas selnya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm dan disamakan ODnya. Sebanyak 1 mL kultur BAL diinokulasikan pada 9 mL MRS *broth* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Sebanyak 5 mL kultur BAL dari masing-masing isolat diinokulasikan pada tabung propilen 15 mL, kemudian dilakukan sentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil dan diatur pH 6,5-7,0 kemudian difiltrasi dengan menggunakan *membran filter* steril dengan pori berdiameter 0,20 µm. Uji penghambatan selanjutnya dilakukan dengan menggunakan *paper blank disc*. Metode ini

dilakukan dengan cara kultur patogen pada media TSB diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C dan dihitung densitas selnya hingga mencapai 10^6 CFU/mL. Kultur patogen tersebut selanjutnya diinokulasikan sebanyak 0,1 mL pada media 0,6% TSA (*soft agar*) dan dilakukan metode *spread plate*. Cawan petri tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama 1 jam. *Cells free supernatant* untuk uji antagonis ini kemudian diinokulasikan sebanyak 50 μ L pada *blank paper disc*. *Blank paper disc* yang telah berisi CFS kemudian diinokulasikan pada media TSA dan diinkubasi kembali pada suhu 4°C selama 30 menit. Tahap berikutnya sampel diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam. Kontrol negatif yang digunakan adalah media MRS *broth* tanpa kultur BAL. Zona hambat yang terbentuk diukur dengan persamaan (1).

3.5.4 Uji toleransi terhadap asam

Uji toleransi terhadap asam bertujuan untuk mengetahui toleransi bakteri asam laktat pada media dengan kondisi asam yang merupakan salah satu syarat dari probiotik. Metode ini dilakukan dengan cara isolat bakteri asam laktat pada media agar miring diinokulasi pada 10 mL MRS *broth* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kultur BAL yang telah tumbuh kemudian diukur densitas selnya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Kultur isolat BAL kemudian disamakan densitas selnya dan diinokulasikan 1 mL pada 9 mL MRS *broth*. Kultur isolat BAL kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Sebanyak 1 mL kultur isolat BAL diinokulasikan pada 9 mL MRS *broth* dengan variasi pH 3 dan 4 dalam tabung reaksi. Variasi pH pada media dibuat dengan menambahkan HCl 1 M hingga mencapai pH yang diinginkan. Kultur BAL yang telah diinokulasi kemudian dihomogenasi dengan vorteks, sampel selanjutnya diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C. Pada jam ke-0 dan ke-3 sampel tersebut diambil sebanyak 0,1 mL dan dilakukan pengenceran dengan 0,9 mL media MRS *broth* sesuai dengan pH media tersebut dalam *microtube* hingga mendapatkan pengenceran 10^{-7} . Hasil dari pengenceran kemudian diambil sebanyak 0,1 mL dan diinokulasikan dengan metode *spread plate* pada cawan petri steril yang telah berisi media MRS agar. Sampel kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada

suhu 37°C. Koloni yang tumbuh dihitung jumlahnya dan dikalkulasi persentase pertumbuhannya (*survival rate*) dengan persamaan (2).

$$\frac{\text{Log CFU N1}}{\text{Log CFU N0}} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

(Qi Han dkk., 2017)

Keterangan :

Log CFU N1: jumlah koloni setelah inkubasi

Log CFU N0: jumlah koloni jam ke-0

3.5.5 Uji toleransi terhadap garam empedu

Uji toleransi terhadap garam empedu dilakukan untuk mengetahui toleransi bakteri asam laktat yang tahan terhadap konsentrasi garam empedu tinggi. Hal ini merupakan salah satu syarat dari karakter bakteri asam laktat. Metode ini dilakukan dengan cara isolat bakteri asam laktat pada media agar miring diinokulasi pada 10 mL MRS *broth* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kultur BAL yang telah tumbuh kemudian diukur densitas selnya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Isolat BAL terpilih kemudian disamakan densitas selnya dan sebanyak 1 mL diinokulasikan pada 9 mL MRS *broth* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kultur BAL kemudian diinokulasikan sebanyak 1 mL pada 9 mL MRS *broth* yang mengandung konsentrasi garam empedu yang berbeda - beda. Konsentrasi garam empedu pada media MRS *broth* yaitu 0,3%, 0,5%, dan 1%. Sampel kemudian diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37°C. Inkubasi pada jam ke-0 dan jam ke-4 dari masing-masing sampel tersebut diambil sebanyak 0,1 mL dan dilakukan pengenceran dalam *microtube* dengan 0,9 mL media MRS *broth* sesuai dengan konsentrasi garam empedu tersebut hingga mendapatkan pengenceran 10⁻⁷. Sebanyak 0,1 mL kemudian diinokulasikan pada cawan petri steril yang telah berisi media MRS agar dan dilakukan metode *spread plate*. Sampel kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Koloni yang tumbuh dihitung jumlahnya dan dikalkulasi persentase pertumbuhannya (*survival rate*) dengan persamaan (2).

3.6 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga kali ulangan pada masing-masing uji yaitu uji toleransi terhadap asam, uji toleransi terhadap garam empedu dan uji penghambatan terhadap bakteri patogen *Vibrio harveyi*. Data yang didapatkan dianalisis uji statistik untuk melihat perbedaan yang signifikan dari masing-masing uji dengan menggunakan analisis varian satu arah (*one way ANOVA*) untuk uji penghambatan isolat BAL terhadap bakteri patogen *Vibrio harveyi* dan *two way ANOVA* untuk uji toleransi terhadap asam dan garam empedu dengan tingkat signifikansi $p \leq 0,05$. Analisis ini menggunakan *software* SPSS 16.0 *for windows*.

3.7 Identifikasi Bakteri Asam Laktat

3.7.1 Ekstraksi DNA Bakteri Asam Laktat

Identifikasi isolat dilakukan dengan menggunakan *FastDNATM SPIN Kit for Soil*. Metode ini dilakukan dengan cara isolat yang berumur 24 jam pada agar miring diambil sebanyak empat ose dan dimasukkan ke dalam 100 μL *aquabidest* dalam *microtube*. Sampel dilakukan *pipetting* kemudian dimasukkan ke dalam *Lysing matrix E tube*, selanjutnya ditambahkan 978 μL *sodium phosphate buffer* dan divorteks selama 10 menit. Sampel kemudian ditambah 122 μL *MT buffer* dan divorteks selama 10 detik, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam *tube* yang baru dan ditambah 250 μL PPS (*Protein Precipitation Solution*). Sampel dihomogenasi dengan cara dibalik dengan tangan selama 10 kali dan didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil sebanyak 800 μL dan dimasukkan ke dalam *microtube* kemudian ditambahkan 800 μL *binding matrix*. Sampel dihomogenasi dengan perlahan. Sebanyak 800 μL sampel diambil dan dipindahkan ke dalam *SPINTM Filter* kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Cairan yang terdapat pada *catch tube* dibuang dan ditambahkan kembali 800 μL *binding matrix* selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan dan waktu yang sama. Cairan yang

berada pada *catch tube* dibuang kembali. Sampel kemudian ditambahkan dengan 500 µl SEWS-M dan dihomogenasi dengan perlahan. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Cairan yang terbentuk pada *catch tube* dibuang kembali dan disentrifugasi dengan kecepatan dan waktu yang sama untuk menghilangkan sisa dari etanol. Sampel yang berada pada *SPINTM Filter* dimasukkan kedalam *catch tube* yang baru sampel didiamkan pada suhu ruang selama 5 menit dengan posisi tutup terbuka. Sampel ditambahkan 100 µl DES kemudian disentrifugasi kembali pada kecepatan dan waktu yang sama. Sampel DNA telah terekstraksi dan berada pada *catch tube* kemudian disimpan pada *freezer* -20°C untuk uji selanjutnya.

3.7.2 Amplifikasi dan sekuensing 16S rDNA

Sampel DNA diamplifikasi dengan sekuens 16S rDNA menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *Thermocycler Amplitron®-1*. Primer yang digunakan dengan primer universal yaitu 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') dan primer 1495R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') (Ng Seah, 2015). Amplifikasi 16S rDNA dengan PCR memiliki komposisi PCR *mix* yang dapat dilihat pada tabel 1. Proses dari PCR dapat dilihat pada tabel 2. Hasil dari amplifikasi divisualisasi menggunakan elektroforesis gel agarose 1,5%.

Tabel 1. Komposisi reaksi PCR

Larutan	Volume (µl)	Konsentrasi
Go tag green	25	-
Forward Primer 27f	2	10 pmol/µl
Reverse Primer 1495r	2	10 pmol/µl
DNA template	2	10-11 ng/µl
ddH2O	19	-
Total	50	

Tabel 2. Proses PCR untuk amplifikasi 16S rDNA bakteri

Proses	Suhu	Waktu	Konsentrasi
Inisial denaturasi	94°C	5 menit	1 siklus
denaturasi	94°C	30 detik	30 siklus
Anneling	52°C	30 detik	30 siklus
Ekstension	72°C	1,5 menit	30 siklus
Final ekstension	72°C	10 menit	1 siklus

Amplikon kemudian disekuensing di *1st BASE DNA Sequencing* Malaysia. Sekuen 16S rDNA yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan *database* yang tersedia dalam NCBI menggunakan BLAST *search engine* <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Sekuens di-copy di *notepad* kemudian dilakukan *alignmnet* pada ClustalW di MEGA6. Kemudian dilakukan analisis pohon filogeni menggunakan *neighbor joining* dengan metode *maximum composite likelihood* pada software MEGA6.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Faktor Abiotik Habitat Kerang Pisau (*Solen Spp.*) di Pesisir Pantai

Faktor abiotik yang diukur dari habitat kerang pisau di pesisir selatan pantai Bangkalan, Madura yang diambil dari tiga titik berbeda sebagai ulangan dengan jarak ± 40 m terdiri dari suhu, salinitas, pH dan konduktivitas. Hasil pengukuran faktor abiotik tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengukuran faktor abiotik habitat kerang pisau

No.	Suhu (°C)	Salinitas (ppt)	pH	Konduktivitas (S/m)
1.	28,2 \pm 0,3	34 \pm 0,2	7,0 – 8,5	2,6

Budidaya kerang pisau maupun dari kelompok Bivalvia lainnya dapat mengalami kendala yaitu terinfeksi oleh penyakit. Penyakit tersebut dapat disebabkan oleh bakteri patogen. Infeksi penyakit akibat bakteri patogen dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kurangnya sirkulasi air dan udara saat pengangkutan dalam tangki selama perjalanan, kondisi perairan yang kurang baik, kualitas pakan yang kurang, kotoran dan sisa pakan yang terlalu banyak serta masuknya bahan pencemar ke dalam lingkungan. Perubahan kondisi lingkungan tersebut berpotensi untuk bakteri patogen dapat menyerang kerang. Salah satu bakteri patogen tersebut adalah *Vibrio harveyi* yang pada dasarnya bersifat oportunistik dan akan menjadi patogen apabila media pemeliharaannya terjadi perubahan secara drastis (Hatmanti 2003).

Bakteri dari genus *Vibrio* diketahui dapat bertahan pada suhu 17°C - 49°C sehingga bakteri tersebut masih dapat bertahan hidup pada suhu rendah maupun tinggi. Bakteri tersebut juga diketahui dapat bertahan pada kondisi garam yang tinggi hingga 100 g/L atau setara dengan 100 ppt (*part per thousand*). Kenaikan salinitas dapat

mempengaruhi pertumbuhan kerang yang hanya dapat bertahan dengan rentang salinitas 29 - 34 ppt dan tidak berpengaruh pada pertumbuhan *Vibrio* sehingga memungkinkan bakteri tersebut menginfeksi kerang. Bakteri dari genus *Vibrio* dapat tumbuh optimum pada pH 6,16 – 7,8. (Armada dkk., 2003; Gallardo dkk., 2016; Leslie dkk., 2012). Kondisi pH untuk *Vibrio* tersebut sesuai dengan kondisi pH pertumbuhan optimum pada kerang sehingga dengan ini peran bakteri asam laktat sangat penting dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Bakteri asam laktat diketahui dapat menghasilkan senyawa asam yang dapat mengubah pH di lingkungan sekitarnya menjadi pH 4,0 hingga 3,8 (Pieniz dkk., 2014; Wahyuni dkk., 2016).

4.2 Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Saluran Pencernaan Kerang Pisau

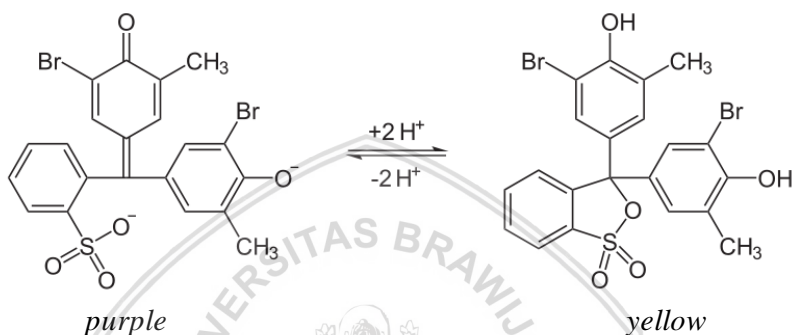
Isolasi bakteri asam laktat dari saluran pencernaan kerang pisau didapatkan sebanyak $9,2 \times 10^2$ CFU/mg berdasarkan hasil *total plate count* (TPC). Berdasarkan hasil tersebut didapatkan 22 isolat secara acak yang menunjukkan adanya zona bening pada media MRS agar. Zona bening menunjukkan larutnya CaCO_3 di area sekitar koloni akibat dihasilkannya asam oleh koloni bakteri pada media MRS agar. Semua isolat yang didapatkan kemudian disubkultur pada media MRS agar yang telah ditambahkan dengan indikator *bromocresol purple* yang menunjukkan adanya perubahan pH pada media. Menurut Bellatar dkk., (2014) media yang telah diberi 0,004% *bromocresol purple* akan berwarna ungu pada pH 6,8 dan berubah menjadi kuning pada pH 5,2. Sebanyak 14 isolat BAL mampu mengubah warna media menjadi kuning terang yang menunjukkan bahwa isolat tersebut menghasilkan asam. Hasil dari pewarnaan Gram menunjukkan semua isolat merupakan bakteri Gram positif dengan uji katalase negatif. Hasil karakterisasi isolat ditunjukkan pada tabel 4.

Tabel 4. Karakteristik isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari usus kerang pisau

No.	Isolat	Perubahan warna media	Gram	Uji katalase
1.	SP1	Kuning terang	+	-
2.	SP2	Kuning lemah	+	-
3.	SP3	Kuning lemah	+	-
4.	SP4	Kuning lemah	+	-
5.	SP5	Kuning lemah	+	-
6.	SP7	Kuning terang	+	-
7.	SP8	Kuning terang	+	-
8.	SP9	Kuning terang	+	-
9.	SP10	Kuning terang	+	-
10.	SP11	Kuning terang	+	-
11.	SP12	Kuning terang	+	-
12.	SP13	Kuning lemah	+	-
13.	SP14	Kuning terang	+	-
14.	SP15	Kuning terang	+	-
15.	SP16	Kuning terang	+	-
16.	SP17	Kuning terang	+	-
17.	SP19	Kuning terang	+	-
18.	SP20	Kuning terang	+	-
19.	SP21	Kuning lemah	+	-
20.	SP22	Kuning terang	+	-
21.	SP23	Kuning lemah	+	-
22.	SP24	Kuning lemah	+	-

Hasil penelitian didukung oleh pendapat Khalid (2011), Bujalance dkk. (2006) dan Bellatar dkk. (2014) menyatakan bahwa BAL memiliki karakteristik berupa katalase negatif karena tidak memiliki enzim katalase yang dapat menguraikan hidrogen peroksida. Penggunaan indikator pH seperti *bromocresol purple* baik digunakan untuk membedakan bakteri yang digolongkan sebagai bakteri asam laktat dan yang bukan BAL. Hal ini disebabkan berubahnya warna media dengan adanya aktivitas metabolisme pada bakteri tersebut. Bakteri asam laktat dapat menghasilkan senyawa asam sehingga

akan mengubah pH media menjadi rendah. Adanya perubahan pH yang rendah tersebut membuat struktur dari *bromocresol purple* berubah pula (Gambar 5). Keasamaan yang rendah akan menyumbangkan H^+ sehingga struktur *bromocresol purple* akan berikatan dengan H^+ dan dengan ini dapat merubah warna media menjadi kuning.



(Bellatar dkk., 2014)

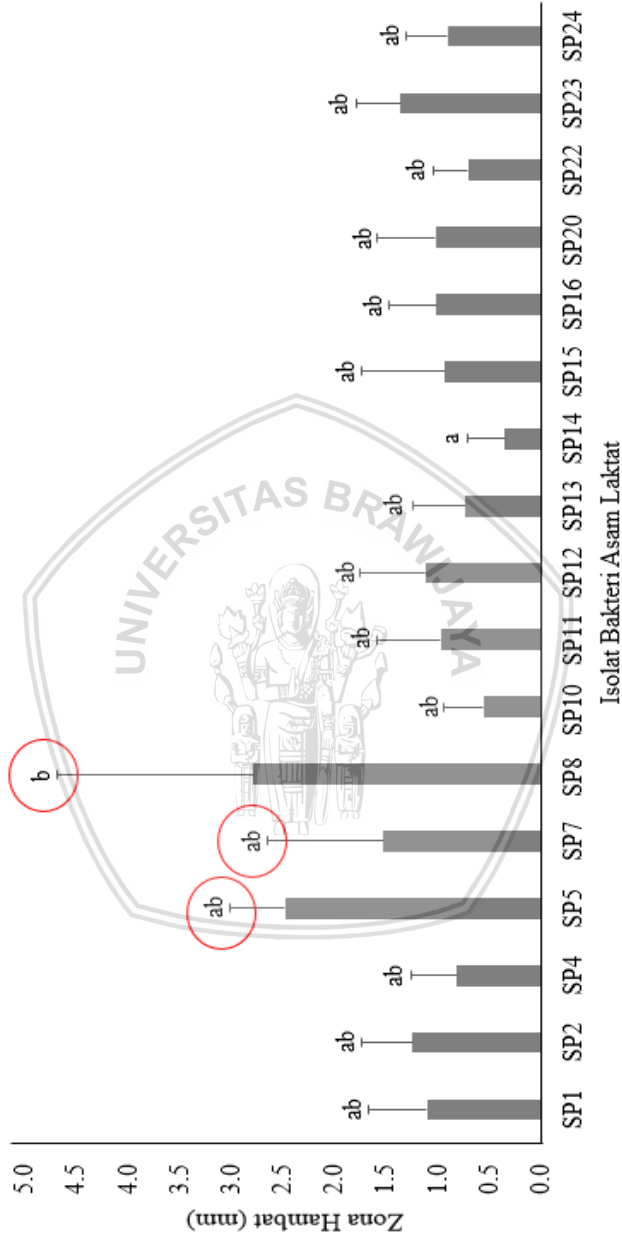
Gambar 5. Perubahan struktur pada *bromocresol purple* yang menyebabkan media menjadi warna kuning

Bakteri asam laktat menghasilkan senyawa asam dengan memanfaatkan gula yang terkandung dalam media MRS agar. Media MRS agar diketahui mengandung *dextrose* yang merupakan gula sederhana. Bakteri asam laktat akan memfermentasi gula untuk memperoleh energi atau untuk menghasilkan ATP (Widodo dkk., 2018). Sebanyak 22 isolat BAL yang diperoleh hanya 17 isolat yang dapat tumbuh baik dalam proses subkultur sehingga akan digunakan dalam uji berikutnya.

4.3 Penghambatan *Crude Cells* Isolat Bakteri Asam Laktat terhadap Bakteri Patogen *Vibrio harveyi*

Isolat BAL sebanyak 17 isolat, dilakukan uji penghambatan terhadap bakteri patogen *Vibrio harveyi*. Isolat tersebut merupakan patogen pada kerang dan memiliki habitat di laut. Berdasarkan hasil analisis terhadap diameter zona hambat, terdapat tiga isolat yang memiliki potensi tertinggi dalam menghambat pertumbuhan *Vibrio harveyi*. Hasil pengukuran diameter zona hambat terhadap *Vibrio harveyi* ditunjukkan pada Gambar 6. Isolat SP8 memiliki diameter zona hambat yang paling besar dengan nilai $2,8 \pm 1,9$ mm. Isolat lainnya yang juga memiliki diameter zona hambat tertinggi adalah isolat SP 5 dan SP 7 berturut-turut sebesar $2,5 \pm 0,5$ mm dan $1,5 \pm 1,1$ mm. Menurut Shehata dkk. (2016) dan Kermanshahi & Elahe (2015) bakteri probiotik seperti bakteri asam laktat dapat bersifat antagonis terhadap bakteri patogen karena dapat memproduksi beberapa senyawa seperti asam laktat, hidrogen peroksida, karbon dioksida dan bakteriosin. Produksi adanya senyawa - senyawa asam tersebut dapat membuat pH di lingkungannya menjadi asam. Molekul asam tersebut akan menembus dinding sel dan mengganggu proses metabolisme serta mekanisme genetik sel bakteri patogen.

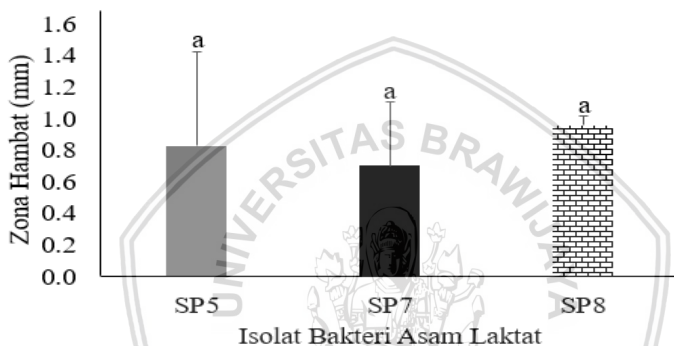
Zona hambat yang terbentuk disebabkan karena adanya perubahan keasaman pada media. Bakteri asam laktat menghasilkan asam laktat yang akan disekresikan ke lingkungan dan menyebabkan beberapa molekul menjadi H^+ dan anion. Hal ini akan menyebabkan adanya perbedaan gradien proton sehingga dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel bakteri patogen yang dapat menyebabkan kerusakan. Komponen yang ada pada intrasel akan keluar sehingga bakteri yang berada disekitarnya akan mati (Lunggani, 2007).



Gambar 6. Penghambatan *crude cells* isolat BAL terhadap bakteri patogen *Vibrio harveyi*

4.4 Penghambatan *Cell Free Supernatant* (CFS) Isolat Bakteri Asam Laktat terhadap *Vibrio harveyi*

Penghambatan *cell free supernatant* dengan kondisi pH netral (6,5 - 7,0) terhadap bakteri patogen *Vibrio harveyi* dihasilkan zona hambat yang lebih kecil nilainya dibandingkan dengan diameter zona hambat dari *crude cells* isolat BAL. Isolat SP8 memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri patogen lebih besar dibandingkan dengan isolat yang lainnya meskipun tidak terdapat adanya beda nyata dengan kedua isolat lainnya (Gambar 7).



Gambar 7. Penghambatan *cell free supernatant* isolat BAL terhadap *Vibrio harveyi*

Gambar 7 menunjukkan bahwa zona hambat yang dihasilkan oleh SP8, SP5, SP7 secara berturut-turut sebesar $1,0 \pm 0,06$ mm, $0,8 \pm 0,6$ mm dan $0,7 \pm 0,4$ mm. Perbandingan hasil dari zona hambat isolat BAL menggunakan *crude cells* dan CFS memiliki persamaan yaitu isolat yang paling besar zona hambatnya adalah SP8 diikuti dengan isolat SP5 kemudian SP7. Zona hambat *crude cells* isolat BAL dibandingkan dengan CFS lebih besar nilai zona hambatnya. Hal ini dapat disebabkan karena menurut penelitian Zapata (2013) *crude cells* dapat menghambat lebih baik karena sel bakteri masih tetap hidup di dalamnya dan dengan adanya stimulus berupa patogen maka bakteri tersebut akan menghasilkan senyawa metabolit untuk menghambat bakteri patogen. Oleh karena itu, supernatan memiliki

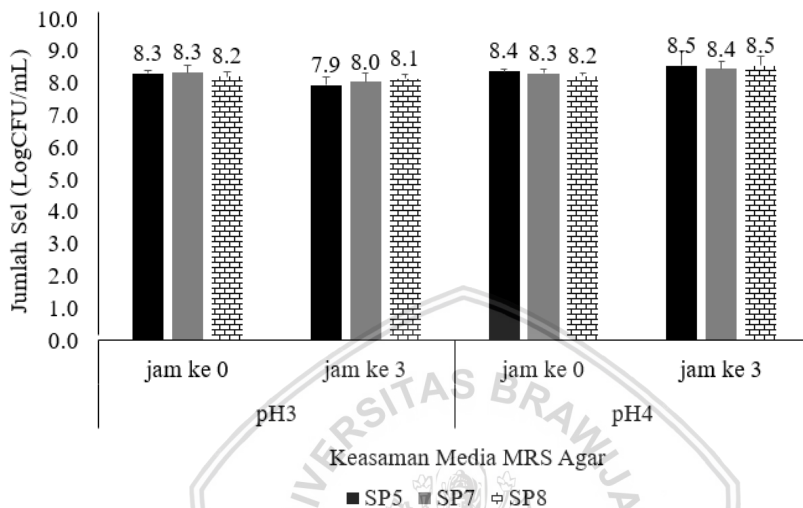
tingkat penghambatan yang rendah karena hanya mengandung senyawa metabolit dari kultur BAL.

Supernatan tidak mengandung sel bakteri asam laktat serta tidak ada perubahan keasaman oleh aktivitas BAL dan hanya mengandung senyawa metabolitnya saja. Namun, hasil penelitian menunjukkan adanya zona hambat walaupun dalam jumlah yang kecil. Hal ini membuktikan bahwa isolat BAL yang diisolasi dari usus kerang pisau dapat menghasilkan senyawa antimikroba yang dapat menghambat bakteri patogen. Menurut Widodo dkk. (2018) & Drider dkk. (2006) Senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh BAL seperti bakteriosin merupakan molekul protein kompleks yang memiliki efek kerusakan pada membran, mengganggu sintesis DNA dan protein. Bakteriosin dapat mengubah permeabilitas membran sel patogen yang akan menyebabkan terbentuknya pori pada membran. Hal ini menyebabkan substansi intrasel akan keluar dari sel dan sel tersebut akan mati. Perubahan permeabilitas membran sel juga akan mengganggu transpor proton sehingga mengakibatkan terhambatnya produksi energi pada biosintesis protein dan asam nukleat. Senyawa lainnya yang dihasilkan yaitu hidrogen peroksida yang dapat menyebabkan efek keracunan akibat permeabilitas membran sel meningkat. Hal ini bersifat bakteriosidal serta destruksi struktur molekuler dasar dari asam nukleat.

4.5 Toleransi Bakteri Asam Laktat terhadap Kondisi Asam

Isolat BAL terpilih diuji karakteristiknya berdasarkan toleransi terhadap kondisi asam. Hal ini dilakukan karena salah satu karakter probiotik adalah mampu bertahan pada kondisi yang asam dalam sistem pencernaan. Hasil yang didapatkan dapat dilihat pada Gambar 8. Isolat BAL mengalami penurunan pada medium dengan pH 3 setelah diinkubasi selama 3 jam. Inkubasi pada jam ke-0 menunjukkan jumlah sel BAL tertinggi terdapat pada SP5 dan SP7 sebesar 8,3 Log CFU/mL, namun setelah inkubasi selama 3 jam menunjukkan bahwa isolat SP8 memiliki jumlah sel yang banyak bertahan dengan nilai yang paling besar yaitu 8,1 log CFU/mL diikuti dengan isolat SP7 sebesar 8 log CFU/mL dan SP5 sebesar 7,9 log CFU/mL. Jumlah sel BAL pada pH4 terus bertambah setelah diinkubasi selama 3 jam. Isolat SP5 dan SP8 memiliki jumlah sel

yang paling tinggi sebesar 8,5 log CFU/mL, sedangkan SP7 sebesar 8,4 log CFU/mL.

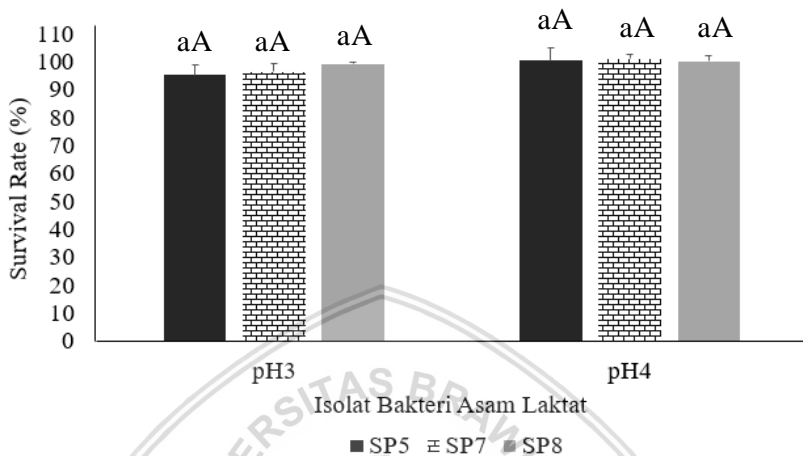


Gambar 8. Toleransi bakteri asam laktat pada kondisi asam.

Menurut Ding dkk. (2017) bakteri probiotik memiliki toleransi terhadap kondisi lingkungan yang asam. Hal ini bermanfaat bagi bakteri untuk mempertahankan diri dalam kondisi lingkungan pada lambung yang memiliki pH 1,5 – 3. Bakteri probiotik seperti bakteri asam laktat dapat bertahan pada pH 3 selama 2 jam. Oleh karena itu, hasil penelitian diatas dapat dikatakan berpotensi sebagai probiotik karena selang waktu 3 jam masih terlihat pertumbuhan BAL yang cukup baik.

Jumlah sel BAL pada pH 4 terus mengalami adanya pertumbuhan yang dapat disebabkan karena kondisi tersebut mendekati pH optimum pertumbuhan BAL. Keasaman media optimum untuk bakteri asam laktat sebesar 5,5 - 5,8 dan dengan adanya aktivitas metabolisme dari bakteri asam laktat yang diketahui dapat menghasilkan senyawa organik berupa asam yaitu asam laktat maupun asam asetat sehingga dapat mengubah pH media lebih rendah dari pH optimumnya. Bakteri asam laktat diketahui dapat

mengubah pH media menjadi 4,0 - 3,8 (Pieniz dkk., 2014; Widodo dkk., 2018; Khalid, 2011).



Gambar 9. *Survival rate* isolat bakteri asam laktat pada kondisi asam
Ket: Notasi berhuruf kecil menunjukkan tidak terdapat beda nyata antarisolat, dan notasi berhuruf kapital menunjukkan tidak terdapat beda nyata antarkeasaman pada media.

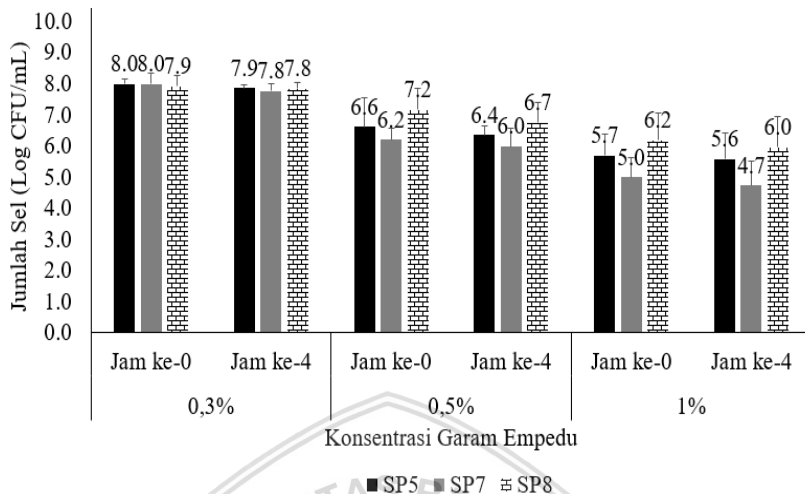
Jumlah sel BAL yang dapat bertahan pada kondisi asam dapat diketahui *survival rate*-nya. *Survival rate* merupakan jumlah total viabilitas sel yang dapat bertahan pada kondisi media asam setelah diinkubasi. Persentase *survival rate* isolat BAL pada kondisi asam dapat dilihat pada Gambar 9. Isolat SP8 berpotensi sebagai probiotik karena memiliki persentase *survival rate* tertinggi dibandingkan dengan isolat BAL yang lainnya pada kondisi pH yang ekstrim yaitu pH 3 hingga mencapai 99% diikuti dengan SP7 sebesar 96% dan SP5 sebesar 95%. Semua isolat BAL pada pH 4 memiliki persentase *survival rate* yang lebih dari 100%. Isolat SP7 memiliki persentase *survival rate* paling tinggi sebesar 101% diikuti dengan SP5 sebesar 100,5% dan SP8 sebesar 100,08%. *Survival rate* isolat BAL pada media asam tidak menunjukkan adanya beda nyata antar isolat

maupun keasaman pH yang menunjukkan bahwa semua isolat BAL memiliki toleransi terhadap pH yang sama.

Hasil yang diperoleh didukung oleh pendapat Qi Han (2017) bahwa untuk mengetahui toleransi BAL pada kondisi keasaman yang rendah dapat dilakukan dengan menumbuhkan BAL pada media asam dengan rentang pH 3,0 – 6,0 yang diinkubasi selama 3 jam. Hasil penelitian tersebut mengatakan bahwa bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* memiliki persentase *survival rate* yang tinggi yaitu lebih dari 90%. Bakteri asam laktat lainnya seperti *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus curvatus* juga memiliki persentase *survival rate* tinggi yaitu lebih dari 90%.

4.6 Toleransi Bakteri Asam Laktat terhadap Garam Empedu

Karakterisasi bakteri asam laktat selanjutnya yaitu mampu bertahan pada kondisi lingkungan yang mengandung garam empedu. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada gambar 10. Hasil yang diperoleh menunjukkan Isolat BAL pada konsentrasi garam empedu sebesar 0,3% menunjukkan jumlah sel yang lebih banyak dibandingkan dengan jumlah sel pada konsentrasi 0,5% dan 1% garam empedu. Isolat SP5 memiliki jumlah sel BAL tertinggi pada konsentrasi 0,3% setelah inkubasi selama empat jam sebesar 7,9 log CFU/mL diikuti dengan SP7 dan SP8 yang memiliki jumlah sel yang sama yaitu 7,8 log CFU/mL. Isolat SP8 pada konsentrasi garam empedu 0,5% setelah diinkubasi selama empat jam memiliki jumlah sel yang paling tinggi sebesar 6,7 log CFU/mL diikuti dengan SP5 sebesar 6,4 log CFU/mL dan SP7 sebesar 6 log CFU/mL. Isolat SP8 memiliki jumlah sel yang paling tertinggi pula pada konsentrasi 1% garam empedu setelah diinkubasi selama empat jam yaitu sebesar 6 log CFU/mL diikuti dengan SP5 sebesar 5,6 log CFU/mL dan SP7 sebesar 4,7 log CFU/mL.

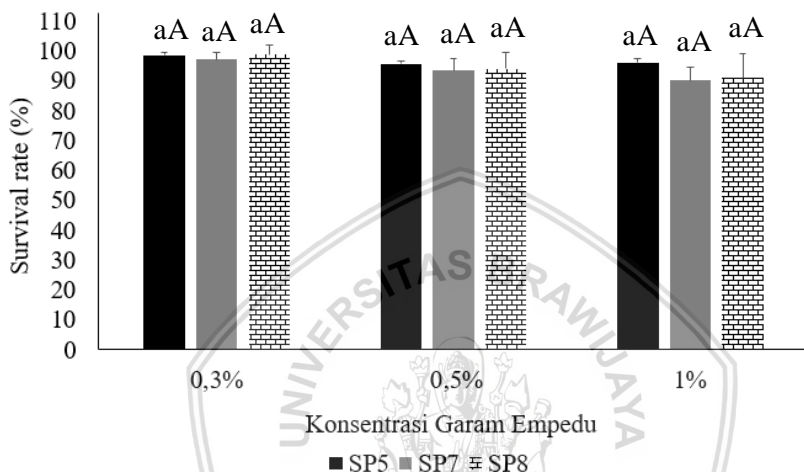


Gambar 10. Toleransi BAL dengan variasi konsentrasi garam empedu.

Jumlah sel BAL dari konsentrasi 0,3% hingga 1% terus mengalami penurunan. Hal ini dapat disebabkan karena semakin tinggi persentase garam empedu maka semakin tinggi kerusakan yang terjadi pada dinding sel bakteri. Garam empedu berfungsi untuk melarutkan *lipid* sehingga dinding sel bakteri yang terdiri atas *lipid* dapat lisis atau terlarut. Hal ini menyebabkan banyak sel bakteri yang tidak mampu bertahan pada konsentrasi garam empedu yang tinggi (Widodo dkk., 2018). Uji toleransi terhadap garam empedu dilakukan karena bakteri probiotik harus tahan terhadap aktivitas metabolit yang terjadi di usus kecil pada *host*-nya. Bakteri probiotik dapat bertahan pada kondisi lingkungan yang mengandung 0,3% garam empedu selama 12 jam. Garam empedu juga berfungsi sebagai antibakteri sehingga menyebabkan strain dari bakteri asam laktat mengalami penurunan populasi pada kondisi media yang mengandung 0,5% maupun 1% garam empedu (Shehata dkk., 2016).

Menurut Guan dkk. (2017) dan Widodo dkk. (2018) bakteri asam laktat dapat bertahan pada kondisi garam empedu yang tinggi melalui reaksi enzimatik yaitu memiliki *bile salt hydrolase enzymatic*

activity. Enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH) mampu menguraikan asam empedu terkonjugasi menjadi asam empedu tidak terkonjugasi dan melepaskan asam amino glisin atau taurin. Bakteri asam laktat juga mempunyai eksopolisakarida (EPS) yang berfungsi sebagai pelindung dari garam empedu.



Gambar 11. *Survival rate* isolat bakteri asam laktat pada kondisi media yang mengandung garam empedu

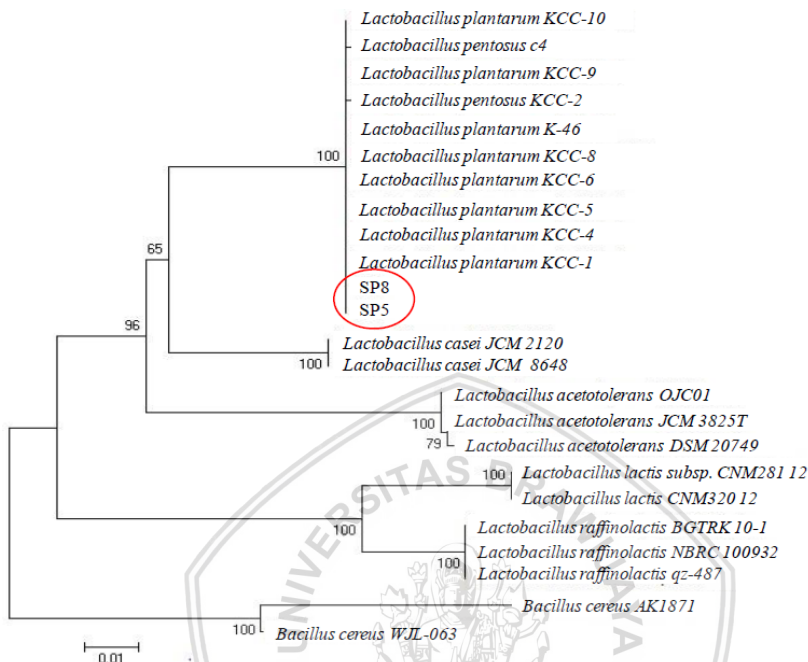
Ket: Notasi berhuruf kecil menunjukkan tidak terdapat beda nyata antarisolat, dan notasi berhuruf kapital menunjukkan tidak terdapat beda nyata antarkonsentrasi pada media.

Gambar 11 menunjukkan *survival rate* semua isolat pada kondisi medium yang mengandung konsentrasi garam empedu yang berbeda-beda. Isolat SP5 dan SP8 memiliki nilai *survival rate* yang tinggi sebesar 99% pada konsentrasi garam empedu 0,3% dan SP7 sebesar 97%. Isolat SP5 pada konsentrasi 0,5% garam empedu memiliki nilai *survival rate* tertinggi sebesar 96% diikuti dengan SP7 dan SP8 yang memiliki nilai *survival rate* yang sama yaitu 94%. Isolat SP5 pada konsentrasi garam empedu 1% memiliki nilai *survival rate* tertinggi

pula dengan nilai 96% diikuti isolat SP8 sebesar 91% dan isolat SP7 sebesar 90%. Jumlah total sel isolat BAL dalam jumlah yang rendah tidak selalu menunjukkan nilai *survival rate* yang rendah pula. Hal ini dapat dilihat pada isolat SP8 dengan konsentrasi 0,5% garam empedu memiliki nilai *survival rate* yang rendah, namun jumlah sel BAL pada isolat tersebut paling tinggi dibandingkan dengan isolat yang lainnya. Nilai *survival rate* ketiga isolat dengan konsentrasi yang berbeda - beda menunjukkan tidak ada beda nyata antar isolat maupun konsentrasi yang artinya ketiga isolat tersebut memiliki ketahanan yang sama terhadap konsentrasi garam empedu.

4.7 Hasil Identifikasi Isolat Bakteri Asam Laktat

Berdasarkan penghambatan isolat BAL terhadap bakteri patogen dipilih isolat SP5 dan SP8 untuk diidentifikasi. Identifikasi secara genotipik menggunakan 16S rDNA menunjukkan bahwa isolat SP5 dan SP8 keduanya merupakan isolat yang sama yaitu *Lactobacillus plantarum* dengan similaritas 100% (Gambar 12). *Lactobacillus plantarum* diketahui sebagai bakteri probiotik yang berdampak positif yang dapat menghasilkan senyawa antimikroba seperti asam organik, hidrogen peroksida, diasetil dan bakteriosin. Berdasarkan dari penjelasan sebelumnya bahwa senyawa-senyawa yang dihasilkan tersebut sangat baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen. *Lactobacillus plantarum* diketahui dapat menghambat bakteri patogen seperti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Listeria monocytogenes* (Arena dkk., 2016). Bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* adalah plantaricin yang dapat aktif pada pH 4,0-6,5 (Varma & Gopi, 2005). Hal ini menjadi alasan pada penghambatan *cell free supernatant* isolat BAL SP5 dan SP8 masih terlihat adanya zona hambat karena pada pH 6,5 atau pH netral bakteriosin dari isolat BAL tersebut masih tetap aktif dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio harveyi*.



Gambar 12. Pohon filogeni isolat BAL SP5 dan SP8

Menurut penelitian Kongnum & Tipparat (2011) menggunakan *Lactobacillus plantarum* untuk menghambat bakteri patogen terhadap udang yaitu *Vibrio harveyi*. *Vibrio harveyi* ini diketahui dapat menyebabkan infeksi pada udang, ikan dan beberapa krustasea lainnya. Penelitian tersebut menguji adanya kompetisi antara *Lactobacillus plantarum* dengan *Vibrio harveyi* menggunakan metode *co-cultivation*. Metode tersebut dilakukan dengan cara mengkulturkan isolat *Lactobacillus plantarum* bersamaan dengan *Vibrio harveyi* dengan kontrol berupa kultur masing-masing isolat tersebut. Hasil yang didapatkan terdapat penurunan jumlah koloni *Vibrio harveyi* dari 7 Log CFU/mL menjadi 1 Log CFU/mL selama 18 jam inkubasi.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Isolasi BAL dari usus kerang pisau didapatkan 22 isolat dengan karakter Gram positif dan katalase negatif. Isolat SP5 dan SP8 dinyatakan berpotensi sebagai probiotik berdasarkan kemampuannya dalam menghambat bakteri patogen *Vibrio harveyi*. Kedua isolat tersebut dapat bertahan pada kondisi asam pH 3 maupun dengan konsentrasi 1% garam empedu.
2. Berdasarkan hasil sekuen 16S rDNA isolat SP5 dan SP8 memiliki similaritas 100% terhadap *Lactobacillus plantarum*.

5.2 Saran

Karakterisasi bakteri asam laktat dapat dilanjutkan dengan melakukan uji toleransi terhadap garam, antibiotik dan uji hemolitik untuk memenuhi persyaratan sebagai bakteri probiotik. Isolasi bakteri asam laktat dapat juga dilakukan secara anaerob untuk mendapatkan bakteri asam laktat yang bersifat anaerob obligat.

DAFTAR PUSTAKA

- Abida, I.W., Eva Ari W., Mahfud E. 2014. Hubungan panjang berat Lorjuk (*Solen spp.*) di perairan pesisir pantai selatan Pulau Madura. *Jurnal Kelautan*. 7(1):26-32.
- Arena, Mattia P., Amandine S., Giovanni N., Francesco G., Djamel D., Giuseppe S. & Daniela F. 2015. Use of *Lactobacillus plantarum* strain as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Frontiers in Microbiology*. 7(2016) 1-10.
- Anggorowati, D.A. 2008. Kematian massal pada usaha budidaya kerang mutiara. *UPT Loka Pengembangan Bio Industri Laut, Pusat Penelitian Oseanografi-LIPI*. 2(2008) 9-14.
- Armada, S.P., Rosa F., Maria J.P. & Teresa P.N. 2003. Effect of temperature, salinity and nutrient content on the survival responses of *Vibrio splendidus* biotype I. *Microbiology*. 149: 369-375.
- Asnailsodysseys. 2010. Learn about clams & relatives. www.asnailsodyssey.com. Diakses 28 Mei 2017.
- Belattar, S., N. Debbeche., N. Segharni & T. Sehili. 2014. Decolorization of bromocresol purple (BCP) photoinduced by a Fe (III) oxyhydroxyde (goethite). *Science and Technologie*. 49-60.
- Bujalance, C., Maria Jimenez V., Encarnacion M., Alfonso Ruiz B. 2006. A selective differential medium for *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Microbiology*. 66(2006) 572-575.
- Ding, Wurong., Chao Shi., Ming Chen., Jianwei Zhou., Ruijun Long. & Xusheng Gou. 2017. Screening for lactic acid bacteria in traditional fermented Tibetan yak milk and evaluating their probiotic and cholesterol-lowering potentials in rats fed a high -cholesterol diet. *Journal of Functional Foods*. 32(2017) 324-332.
- Drider, D., Fimland G., Hechard Y., McMullen & Prevost H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70(2): 564-582.

- Forhad, M.H., S.M. Khaledur R., Md. Shahedur R., Forhad Karim S., & Krishno C. B. 2015. Probiotic properties analysis of isolated lactic acid bacteria from buffalo milk. *Archives of Clinical Microbiology*. 7(1):1-6.
- Friedman, C.S., Karl B.A., K. Beauchamp., James D.M., Thea R.R., Jeffrey D.S., & Ronald P.H. 2009. *Candidatus Xenohaliotis californiensis* a newly described pathogen of abalone, haliotis spp. along the west coast of North America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50:847-855.
- Gallardo, K., Jonathan E.C., Francisco R., Lorena V.E. & Cecilia S.D. 2016. The ecological coherence of temperature and salinity tolerance interaction and pigmentation in a non-marine *Vibrio* isolated from Salar de Atacama. *Frontiers in Microbiology*. 7:1-10.
- Guan, X., Qingxian Xu., Yi Zheng., Lei Qian, Bin lin. 2017. Screening and characterization of lactic acid bacterial strains that produce fermented milk and reduce cholesterol levels. *Brazilian Journal of Microbiology*. 48(2017) 730-739.
- Guerra, A. Cesar L.S., Miguel B.G., & Fiz da Costa G. 2011. **Razor Clams**. Xunta De Galicia. Santiago.
- Hatmanti, A. 2003. Penyakit bacterial pada budidaya krustasea serta cara penanganannya. *Bidang Dinamika Laut, Pusat Penelitian Oseanografi-LIPI*. 28(3) 1-10.
- Hawaz, E. 2014. Isolation and identification of probiotic acid bacteria from curd and in vitro evaluation of its growth inhibition activities against pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*. 8(13)-1419-1425.
- Kermanshahi, Rouha K. & Elahe Mobarak Q. 2015. Inhibition effect of lactic acid bacteria against food born pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Applied Food Biotechnology*. 2(4) 11-19.
- Khalid, Khalisanni. 2011. An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*. 1(3) 1-13.
- Kongnum, K. & Tipparat H. 2011. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged

- with *Vibrio harveyi*. *Fish & Shellfish Immunology*. 32(1) 170-177.
- Lahtinen, S., Arthur C.O., Seppo S., & Atte Von W. 2012. **Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects**. CRC Press. Boca Raton.
- Leslie V.A., Margaret Muthu R.A. & Balasingh A. 2012. Distribution profile of *Vibrio harveyi* in *Panulirus homarus*. *International Research Journal of Biological Sciences*. 1(4) 61-64.
- Lunggani, A.T. 2007. Kemampuan bakteri asam laktat dalam menghambat pertumbuhan dan produksi Aflatoksin B₂ *Aspergillus flavus*. *BIOMA*. 9(2) 45-51.
- Ng Seah, Young. 2015. Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Malaysian fermented Bambang (Mangifera pajang). *Journal of Food*. 13(4):563-572.
- Nurjanah, Tarman K., Rusyadi S. 2008. Karakteristik gizi dan potensi pengembangan kerang pisau (*Solen spp*) di perairan Kabupaten Pamekasan, Madura. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 13(1): 41-51.
- Nurjanah., Agoes M. J., & Rianda Gita F. 2013. Komposisi kimia Kerang Pisau (*Solen sp.*) dari Pantai Kejawan, Cirebon, Jawa Barat. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 16(1):22-32.
- Paillard, Christine. 2017. **Brown ring disease: a vibriosis affecting clams *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus***. International Council for the Exploration of the Sea. Denmark.
- Pieniz, Simone., Robson A., Thiago A., Flavio C. & Adriano B. 2014. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*. 37(2014) 251-256.
- Pierre-Marie, C.C., Saulius K. 2014. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*. 13(59):1-23.
- Qi Han, Baohua Kong., Qian Chen., Fangdaa Sun., Huan Zhang. 2017. In vitro comparison of probiotic properties of lactic acid

- bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics. *Journal of Functional Foods*. 32(2017) 391-400.
- Saeedi, H., Mark J.C., & Rudi Von C. 2013. First report of anterior pallial tentacles in *Solen dactylus* (Bivalvia: Solenidae) from the Northern Persian Gulf, Iran. *Plosone*. 8(5):1-7.
- Shah, R. 2016. 20 Representative types of Molluscs (with diagram). www.biologydiscussion.com. Diakses tanggal 28 Mei 2017.
- Shehata, MG., S.A. El Sohaimy., Malak A.E., M.M. Youssef. 2016. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Science*. 61(1) 65-75.
- Sonomoto, K & Atsushi Y. 2011. **Lactic acid bacteria and Bifidobacteria: Current progress in advanced research**. Caister Academic Press. Norfolk.
- Sunaryanto, R., & Tarwadi. 2015. Isolasi dan karakterisasi bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus lactis* dari sedimen laut. *Jurnal Kelautan dan Perikanan*. 10(1):11-18.
- Trsiyani, N. & Karma B. 2015. Genetic diversity of razor clam (*Solen sp.*) at Pamekasan beaches and Surabaya east coast Indonesia based on RAPD markers. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* (JBES). 7(6):267-274.
- Varma, Ajit & Gopi K. Podila. 2005. **Biotechnological Applications of Microbes**. I.K. International Pvt.Ltd. India.
- Vine, Niall G., Winston D. Leukes., & Horst K. 2006. Probiotics in marine larviculture. *Federation of European Microbiological Societies*. 30:404-427.
- Wahyuni, E. A., Insafitri., Gatot C. & Mohammad N.I. 2016. Distribusi *Solen sp.* di Perairan Kabupaten Bangkalan. *Jurnal Kelautan*. 9(1):17-22.
- Widiyaningsih, E.N. 2011. Peran probiotik untuk kesehatan. *Jurnal Kesehatan*. 4(1):14-20.
- Widodo., Tutik Dwi W., Arief N., Endang W., Tiya Tono T., Nosa Septiana A.A., Sri L., Pradipta Ayu H., Ari Surya S. & Robet H. 2018. **Bakteri asam laktat strain lokal: Isolasi sampai aplikasi sebagai probiotik dan stater fermentasi susu**. UGM Press. Yogyakarta.

- Wildlife. 2016. Abalone diseases and pests. California Department of Fish and Wildlife. www.wildlife.ca.gov. Diakses tanggal 01 Oktober 2017.
- Zapata, Ana A. 2013. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Nile Tilapia intestine (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Biology and Life Science*. 4(1) 164-167.
- Zorriehzahra, M.J., Somayeh T.D., Milad A., Ruchi T., K. Karthik., Kuldeep D. & Carlo C.L. 2016. Probiotic as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action. *Journal of Veterinary Quarterly*. 36(4):228-241

